

Thesis

WURZBURG

1967

ÜBER DIE WECHSELWIRKUNGEN ZWISCHEN
ANTIBIOTICA UND NUCLEINSÄUREN

Das Assoziat aus Chromomycin A₃ und DNA

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität
Würzburg

vorgelegt von
Dipl. Chem. Wilhelm Behr
aus Gummersbach
Würzburg 1967

LANE MEDICAL LIBRARY OF
STANFORD UNIVERSITY
300 PASTEUR ROAD
PALO ALTO, CALIFORNIA

ÜBER DIE WECHSELWIRKUNGEN ZWISCHEN
ANTIBIOTICA UND NUCLEINSÄUREN

Das Assoziat aus Chromomycin A₃ und DNA

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität
Würzburg

vorgelegt von
Dipl. Chem. Wilhelm Behr
aus Gummersbach
Würzburg 1967

Eingereicht am: 7. Juni 1967

Tag der mündlichen Prüfung: 26. Juli 1967

Berichterstatter: Prof. Dr. G. Hartmann

Dr. Urkunde erhalten: 10. 8 67

MEINEN LIEBEN ELTERN
IN DANKBARKEIT GEWIDMET

Vorbemerkung:

In einer Ausschlagtafel am Schluß der Arbeit sind die in dieser Arbeit verwendeten Abkürzungen zusammengestellt.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
<u>Einleitung</u>	1
<u>Material und Methoden</u>	3
<u>Ergebnisse</u>	11
I. <u>Metallionen und Assoziatbildung</u>	11
II. <u>Einfluß der Sekundärstruktur der DNA</u>	15
III. <u>Einfluß der Basenzusammensetzung der DNA</u>	18
IV. <u>Größe des blockierten DNA-Abschnitts</u>	20
1. Versuchsplanung	20
2. Verlauf der Hydrolyse	22
3. Chromomycinhaltige Abbauprodukte	25
4. Chromomycinfreie Abbauprodukte	30
5. Assoziatbildung der chromomycinfreien Abbauprodukte	33
<u>Diskussion</u>	35
<u>Zusammenfassung</u>	38
<u>Literaturverzeichnis</u>	39
<u>Abkürzungsverzeichnis:</u> Ausschlagtafel am Schluß der Dissertation	42



Digitized by the Internet Archive
in 2026

E i n l e i t u n g

Das Antibioticum Chromomycin A₃ (Fig.1) entfaltet durch seine cytostatische Wirkung eine hohe Antitumoraktivität (Sato et al. 1960). Sie kann mit der Hemmung der Nucleinsäuresynthese gedeutet werden (Wakisaka et al. 1963; Kersten und Kersten 1965; Kida et al. 1966; Kamiyama und Kaziro 1966). Auch die DNA-abhängigen Polymeraseenzyme werden in vitro durch das Antibioticum gehemmt (Hartmann et al. 1964; Kaziro und Kamiyama 1965; Koschel et al. 1966). Da Chromomycin wie Actinomycin mit DNA zu assoziieren vermag, liegt es nahe, die Inhibitorwirkung des Antibioticums mit der Blockierung der

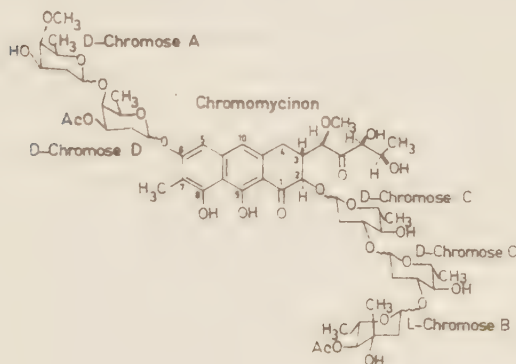


Fig.1. Strukturformel von Chromomycin A₃.
(nach Miyamoto et al. 1966, korrigiert um einen
zusätzlichen D-Chromose C-Rest nach Berlin et
al. 1966).

* vgl. Abkürzungsverzeichnis auf der Ausklapptafel am
Ende der Arbeit.

Matrizenfunktion der DNA zu erklären (Behr und Hartmann 1965; Kersten und Kersten 1965; Kazirow und Kamiyama 1965; Ward et al. 1965; Kersten et al. 1966). Zum Verständnis des molekularen Wirkungsmechanismus des Chromomycins kann daher das Studium seiner Assoziatbildung mit DNA sehr beitragen.

Die Bindung des Chromomycins an DNA läßt sich am bequemsten durch spektralphotometrische Messungen verfolgen. Bei der Assoziation werden zwei sehr schwache Absorptionsbanden des Chromomycins bei etwa 317 und 430 m μ ganz wesentlich verstärkt, während die Absorptionsbande bei 406 m μ nahezu völlig verschwindet (Behr und Hartmann 1965). Diese Veränderung ist von der Basenzusammensetzung der DNA in sehr weiten Grenzen unabhängig. Mit Hilfe dieser einfachen Methode haben wir untersucht, welche Rolle Metallionen bei der Assoziatbildung des Antibioticums mit der DNA spielen und welchen Einfluß die Sekundärstruktur der DNA und ihre Basenzusammensetzung auf die Komplexbildung haben.

Zum Verständnis der Hemmwirkung des Chromomycins auf enzymatische Reaktionen, die an der DNA-Matrize ablaufen, erschien es weiterhin interessant zu untersuchen, wie weit die Wirkung des assoziierten Antibioticums auf dem DNA-Strang reicht. Diese Frage haben wir an der Wirkung der Desoxyribonuclease I aus Pankreas auf chromomycinhaltige DNA studiert.

Material und Methoden

Chromomycin A₃ (Takeda Chemical Industries Ltd., Osaka, Japan) wurde in bidestilliertem Wasser in der Kälte gelöst. Für die Berechnung des Molekulargewichts (1053) wurde die Bruttoformel C₅₁H₇₂O₂₃ (Miyamoto et al. 1966) zugrunde gelegt. Mit der Korrektur um einen zusätzlichen D-Chromose C-Rest (Berlin et al. 1966) erhöht sich das Molekulargewicht um 11% auf 1182.

Kalbsthymus-DNA wurde nach Zamenhof 1958 hergestellt. Micrococcus lysodeicticus- und Escherichia coli-DNA (nach Marmur 1961 hergestellt) und T2-Phagen-DNA (nach Gierer und Schramm 1956 und Kaiser und Hogness 1960 hergestellt) waren ein Geschenk von Dr. K. Koschel.

Wenn nicht anders angegeben ist, wurde Kalbsthymus-DNA verwendet.

Desoxyribonuclease I aus Rinderpankreas haben wir von der Firma Worthington Biochemical Corp., Freehold N.J., USA und lyophilisiertes Gift von Crotalus adamanteus vom Ross Allen's Reptile Institute, Inc., Silver Springs, Florida, USA bezogen.

Zum Dialysieren wurden Visking-Dialysierschläuche der Typen 8/32, 20/32 und 27/32 (je nach dem zu dialysierenden Volumen) verwendet.

Zur Herstellung von Cellulose-Dünnschichtplatten (0,25 mm Auftragsdicke) wurde MN 300-Cellulose der Firma Macherey, Nagel & Co, Düren nach Auswaschen mit Butanol/NH₃, Butanol, Methanol/HCl, Methanol, Aceton und Äther verwendet.

Die Bestimmung der Basenzusammensetzung der DNA und ihrer Abbauprodukte erfolgte durch Hydrolyse mit Ameisensäure nach Wyatt und Cohen (Wyatt und Cohen 1953) und Auftrennung der Basen auf Cellulose-Dünnschichtplatten in zweidimensionaler Chromatographie mit Methanol/HCl/H₂O (65/17/18) und wassergesättigtem n-Butanol/NH₃ (100/1) als Fließmittel (Koschel, Unveröffentlicht). Zur Berechnung wurden die im Katalog der Schwarz BioResearch, Inc., Orangeburg, N.Y., USA 1966, Seite 58 angegebenen Extinktionskoeffizienten verwendet.

Tabelle 1

Basenzusammensetzung von Kalbsthymus-DNA und ihrer Abbauprodukte.

	G [μMol]	C [μMol]	A [μMol]	T [μMol]	A+T/G+C
Kalbsthymus-DNA	0,0536	0,0550	0,0732	0,0711	1,33±0,07 ^x
chromomycinhaltiges Abbauprodukt	0,0526	0,0511	0,0286	0,0267	0,55±0,04
chromomycinfreies Abbauprodukt	0,0506	0,0486	0,0259	0,0247	0,51±0,04

^x gibt die maximale Streuung bei mehreren Bestimmungen an.

Die Bestimmung des Phosphatgehaltes der Nucleinsäurepräparate erfolgte nach der Methode von King (King 1932) in der Ausführung nach Liersch (Liersch 1964).

Die optischen Bestimmungen wurden im Spektralphotometer Zeiss PMQ II durchgeführt.

Quantitative Chromomycinbestimmungen erfolgten mit den in Tabelle 2 zusammengestellten Extinktionskoeffizienten (gemessen nach Behr und Hartmann 1965).

Tabelle 2

Extinktionskoeffizienten von Chromomycin A₃ und seinen Assoziaten mit Nucleinsäuren (in 0,05 M Kaliumphosphatpuffer pH 7,0 und 0,0002 M MgCl₂).

	ϵ [cm ² /μMol Chromomycin A ₃]		
	406 mμ	430 mμ	440 mμ
Chromomycin A ₃	9,3	4,6	3,8
Chromomycin-DNA-Assoziat ^x	7,9	10,5	10,1
Assoziat aus Chromomycin und denaturierter DNA	6,4	8,8	8,5
Assoziat aus Chromomycin und DNA-Abbauprodukten	6,5	9,1	8,8

^xebenso die Assoziat mit Micrococcus lysodeleticus-, Escherichia coli- und T2-Phagen-DNA.

Das Bindungsvermögen von Nucleinsäuren für Chromomycin wurde in Anlehnung an die bei Behr und Hartmann (Behr und Hartmann 1965) beschriebene Methode bestimmt. Hierbei wurde zu einem Überschuß von Chromomycin (z.B. 0,028 μMol in 0,80 ml) Nucleinsäure in Portionen von 0,01 bis 0,03 ml zugegeben und die Extinktion bei 440 mμ

gegen einen Vergleich ohne Chromomycin gemessen. Die zugegebene Menge an Nucleinsäure war so bemessen, daß nach Erreichen eines Volumens von 0,90 bis 0,95 ml das gesamte Chromomycin in der Mischung gebunden war. Die gemessenen Extinktionswerte wurden durch Multiplikation mit dem jeweiligen Volumen auf ein einheitliches Bezugsvolumen von 1,0 ml umgerechnet. Aus diesen Werten lassen sich mit der Beziehung (Behr und Hartmann 1965)

$$\text{Chromomycin}_{\text{geb.}} = \frac{\Delta E_{440} - \xi_{440} \cdot \text{Chromomycin}_{\text{einges.}}}{\xi'_{440} - \xi_{440}} \quad (1)$$

(Chromomycin in μMol ; ξ und ξ' Extinktionskoeffizienten des freien und gebundenen Chromomycin in $\text{cm}^2/\mu\text{Mol}$) die jeweils gebildeten Assoziatmengen berechnen. Trägt man die Assoziatmenge (in μMol) gegen die Menge eingesetzter Nucleinsäure (in μMol) auf, so läßt sich aus dem anfänglichen linearen Anstieg der Kurve die Bindungskapazität ablesen (Fig.2).

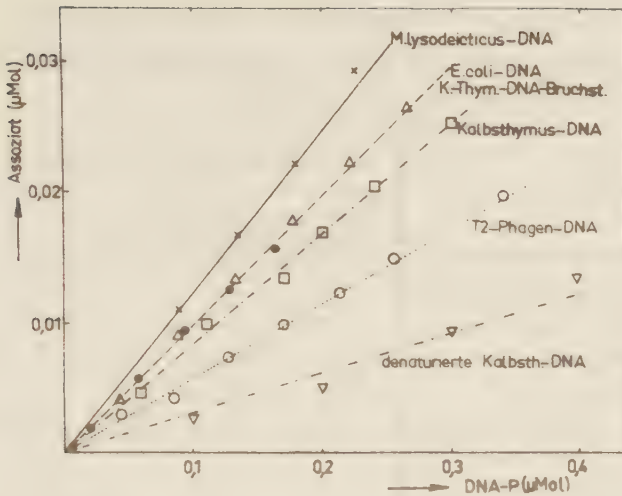


Fig.2. Bestimmung der Bindungskapazität von Nucleinsäuren für Chromomycin A_3 .

Zusammensetzung: 0,028 μMol Chromomycin A_3 (für *M. lysodeicticus*-DNA), 0,020 μMol Chromomycin A_3 (für Kalbthymus-DNA-Bruchstücke), 0,034 μMol Chromomycin A_3 (für *E. coli*-DNA und Kalbthymus-DNA), 0,031 μMol Chromomycin A_3 (für T2-Phagen-DNA) bzw. 0,033 μMol Chromomycin A_3 (für denaturierte kalbthymus-DNA); *—*—* *M. lysodeicticus*-DNA, Δ - Δ -*E. coli*-DNA, $\bullet$ - $\bullet$ -Kalbthymus-DNA-Bruchstücke, $\square$ - $\square$ -Kalbthymus-DNA, $\circ$ - $\circ$ -T2-Phagen-DNA und ∇ - ∇ -denaturierte Kalbthymus-DNA in den auf der Abszisse angegebenen Menge in 0,05 M Kaliumphosphatpuffer pH 7,0 + 0,0002 M MgCl_2 ; Volumen 0,80 - 1,00 ml (mit Ausnahme der Bestimmung bei denat. DNA, die zur Vermeidung von Renaturierung für jeden Meßpunkt neu in 1,00 ml Volumen einpipettiert wurde); Schichtdicke 10 mm; gemessen wurde gegen Vergleichsküvetten ohne Chromomycin A_3 ; auf der Ordinate sind die mit Gleichung (1) errechneten Werte aufgetragen.

Tabelle 3

Bindungskapazität und Assoziationskonstante verschiedener Nucleinsäuren für Chromomycin A₃.

	Bindungskapazität		Assoziationsk.
	nach Behr u. Hartmann	nach Klotz	
M. lysodeicticus-DNA	8 : 1	-	-
E. coli-DNA	10 : 1	-	-
Kalbsthymus-DNA	12 : 1	10 : 1	$0,2 \cdot 10^6 \text{ Mol}^{-1}$
T2-Phagen-DNA	18 : 1	-	-
denat. Kalbsth.-DNA	32 : 1	24 : 1	$6,0 \cdot 10^6 \text{ Mol}^{-1}$
AeDTE behandelte DNA	$>200 : 1^x$	-	-
DNA-Bruchstücke	10 : 1	10 : 1	$0,2 \cdot 10^6 \text{ Mol}^{-1}$

^xDieser Wert wurde, da wegen der geringen Bindungskapazität die Bestimmung des Extinktionskoeffizienten des Assoziats Schwierigkeiten machte, aus dem Kurvenverlauf von ΔE_{440} gegen $\mu\text{Mol DNA-P}$ abgeschätzt.

Die Affinität der Nucleinsäure zu Chromomycin wurde durch die Assoziationskonstante K (Gleichung 3)(Seite 22) charakterisiert. Sie wurde mit der von Klotz (Klotz 1953) angegebenen Beziehung

$$\frac{r}{c} = K_n - K_r \quad (2)$$

(r =Konzentration an Assoziat/Konzentration an Nucleinsäure(bestimmt nach Behr und Hartmann 1965);
 $c = [\text{Chromomycin}_{\text{einges.}}] - [\text{Chromomycin}_{\text{geb.}}] = \text{Konzentration an freiem Chromomycin}$; n = Bindungskapazität)
 bestimmt. Bei der graphischen Darstellung (r/c Ordinate;

r Abszisse) ergibt sich K aus der Steigung der Geraden und n als Schnittpunkt mit der Abszisse (Fig.3).

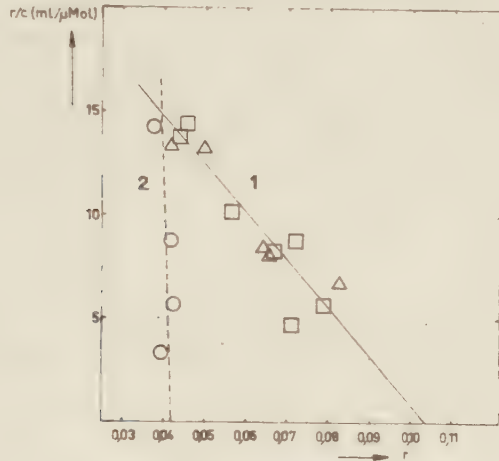


Fig.3. Bestimmung der Affinitätskonstanten von nativer und denaturierter Kalbsthymus-DNA und der DNA-Bruchstücke für Chromomycin A_3 .

Zusammensetzung: 0,0765 μMol DNA-P und steigende Mengen an Chromomycin A_3 (0,0065 - 0,0199 μMol) $\triangle-\triangle$ (Gerade 1); 0,282 μMol DNA-P Bruchstück und steigende Mengen Chromomycin A_3 (0,0180 - 0,0352 μMol) $\square-\square$ (Gerade 1) und 0,374 μMol denat. DNA-P und steigende Mengen chromomycin A_3 (0,0166 - 0,0266 μMol) $\bigcirc-\bigcirc$ (Gerade 2) in 0,05 M Kaliumphosphatpuffer pH 7,0 + 0,0002 M MgCl_2 ; Volumen 1,00 ml; Schichtdicke 10 mm; gemessen wurde gegen Vergleichsküvetten ohne Chromomycin A_3 bei 440 m μ ; aufgetragen sind die nach Gleichung (2) errechneten Werte.

Die Bestimmung der Diffusions- und Sedimentationskonstanten erfolgte in der Spinco-Ultrazentrifuge Modell E der Firma Beckman mit der Schlierenoptik bei 20°C oder mit der UV-Optik und UV-Scanner bei 25°C im AnD-Rotor. Die Proben waren in Natrium-Kaliumphosphatpuffer pH 7,0 Ionenstärke I = 0,1 (Green 1933) gelöst. Die Konzentration der Nucleinsäuren betrug bei den Messungen bei 20°C zwischen 1,2 und 2,5 µMol Nucleotid-P und bei den Messungen bei 25°C zwischen 0,06 und 0,11 µMol Nucleotid-P.

Tabelle 4

Sedimentations- und Diffusionskonstanten der DNA-Abbauprodukte.

	S ₂₅	S ₂₀	D ₂₀
chromomycinhaltiges Abbauprodukt	3,1 S	2,8 S 3,4 S	$7,4 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ sec}^{-1}$
chromomycinfreies Abbauprodukt	2,4 S	2,4 S	$8,5 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ sec}^{-1}$
chromomycinfreies Abbauprodukt erhitzt	1,3 S	0,9 S	-

E r g e b n i s s e

I. Metallionen und Assoziatbildung

Über die Notwendigkeit von Metallionen zur Assoziatbildung des Chromomycins mit DNA liegen unterschiedliche Beobachtungen vor. So beobachtete man bei Zugabe von selbsthergestellten und käuflichen DNA-Präparaten zu Chromomycinlösungen die Komplexbildung auch ohne weiteren Metallionenzusatz anhand verschiedener physikalisch-chemischer Veränderungen an der Nucleinsäure oder dem Antibioticum (Kersten und Kersten 1965; Behr und Hartmann 1965; Kazirol und Kamiyama 1965). Ward und Mitarbeiter hingegen fanden eine Assoziatbildung erst nach Zusatz von Magnesiumionen (Ward et al. 1965).

Es ist schon seit längerem bekannt (Wacker und Vallee 1959), daß DNA, in der üblichen Weise hergestellt, beträchtliche Mengen an Metallionen enthält. Es erschien uns daher wichtig, DNA zunächst möglichst weitgehend von zweiwertigen Metallionen zu befreien. Hierzu haben wir Kalbsthymus-DNA 25 Stunden lang gegen 0,1 M AeDTE-Lösung pH 9,8 dialysiert. Denn nur in diesem alkalischen Bereich sind die Komplexzerfallskonstanten der AeDTE-Komplexe hinreichend klein, um die Konzentration an freien zweiwertigen Metallionen wie Mg^{2+} , Ca^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} etc. sehr niedrig zu halten (Schwarzenbach und Flaschka 1965). In dieser Konzentration verändert AeDTE das Spektrum von freiem Chromomycin. Daher wurde es anschließend durch sechstägige Dialyse gegen 0,05 M Natriumchloridlösung wieder entfernt, bis sich in der DNA-Lösung kein freies AeDTE mehr nachweisen ließ.

Die spektralphotometrische Bestimmung der Bindungskapazität der so behandelten DNA ergab, daß nur noch von durchschnittlich 200 Nucleotiden der DNA ein Chromomycinmolekül gebunden wird (Tabelle 3). Bei unbehandelter DNA trifft dagegen schon auf etwa 29 Nucleotide ein gebundenes Chromomycinmolekül (Behr und Hartmann 1965).

Ein Zusatz von nur 10^{-4} M Magnesiumchlorid zur AedTE-behandelten DNA bewirkt sofort wieder eine starke Assoziation mit dem Antibioticum.

Eine ähnliche Wirkung haben auch Eisen-II-Ionen (nicht aber Eisen-III-Ionen). Doch ist das Spektrum des Eisen-II-Chromomycin-DNA-Assoziats etwas verschieden von dem des Magnesiumkomplexes. Eisen-II-Ionen bewirken aber auch ohne DNA schon eine Veränderung des Spektrums des freien Chromomycins, während Magnesium in der gleichen Konzentration ohne wesentlichen Einfluß ist (Fig.4)(Behr und Hartmann 1965).

Aus dem Spektrum des Assoziats ohne Metallionenzusatz kann man nicht ohne weiteres erkennen, welche Metallionen in der unbehandelten DNA die Komplexbildung bewirken.

Der natürliche Gehalt der von uns dargestellten Kalbsthymus-DNA-Präparate an zweiwertigen Metallionen reicht offensichtlich nicht für eine maximale Bindung des Antibioticums an die DNA aus. Die Bindungskapazität der Nucleinsäure für Chromomycin nimmt nämlich bei Zusatz von 10^{-4} M Magnesiumchlorid zur unbehandelten DNA beträchtlich zu. Jetzt trifft auf etwa 12 Nucleotide der DNA ein gebundenes Chromomycinmolekül (Tabelle 3).

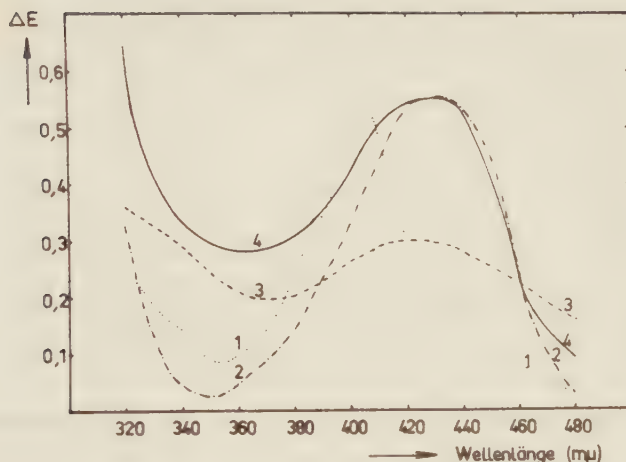


Fig.4. Einfluß von Magnesium- und Eisen-II-Ionen auf das Spektrum von Chromomycin A_3 und des Chromomycin-DNA-Assoziats.

Zusammensetzung: 0,071 μmol Chromomycin A_3 und 0,1 μmol MgCl_2 in 0,05 M Kaliumphosphatpuffer pH 7,0 (Kurve 1) ohne und mit ---- (Kurve 2) 2,0 μmol DNA-P; 0,071 μmol Chromomycin A_3 und 0,1 μmol FeSO_4 in 0,05 M TRIS-HCl-Puffer pH 7,0 ---- (Kurve 3) ohne und mit — (Kurve 4) 1,1 μmol DNA-P; Volumen 1,00 ml; Schichtdicke 10 mm; gemessen wurde gegen Vergleichsküvetten ohne Chromomycin A_3 .

Magnesiumionen erhöhen nicht nur die Bindungskapazität der DNA für Chromomycin, sondern sie beschleunigen auch die Assoziatbildung ganz erheblich (Fig.5).

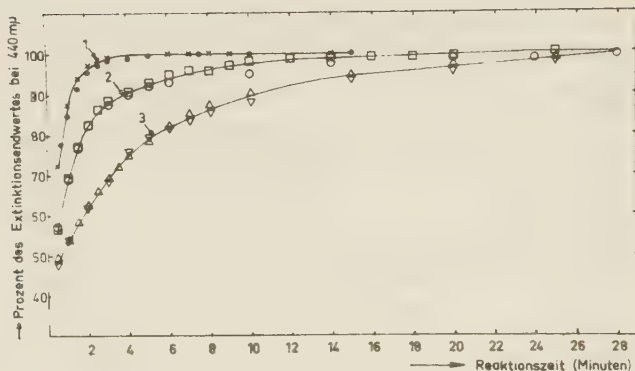


Fig.5. Einfluß von Metallionen und Komplexbildnern auf die Bildungsgeschwindigkeit des Chromomycin-DNA-Assoziats.

Zusammensetzung: 4,0 μMol DNA-P mit ○—○ (Kurve 2) 0,065 μMol Chromomycin A_3 in TRIS-HCl-Puffer pH 7,0, □—□ (Kurve 2) 0,072 μMol Chromomycin A_3 + 0,1 μMol FeCl_3 in TRIS-HCl-Puffer pH 7,0, ●—● (Kurve 1) 0,074 μMol Chromomycin A_3 + 0,1 μMol MgCl_2 in Kaliumphosphatpuffer pH 7,0, ×—× (Kurve 1) 0,072 μMol Chromomycin A_3 + 0,1 μMol FeCl_2 in TRIS-HCl-Puffer pH 7,0, △—△ (Kurve 3) 0,074 μMol Chromomycin A_3 + 1,0 μMol AedTE in 0,05 M Kaliumphosphatpuffer pH 7,0 bzw. ▽—▽ (Kurve 3) 0,074 μMol Chromomycin A_3 in 0,05 M Citratphosphatpuffer pH 7,0; Gesamtvolumen 1,0 ml; Schichtdicke 10 mm; gemessen wurde bei 440 mμ gegen Vergleichsküvetten ohne Chromomycin A_3 im temperierbaren Küvettenhalter bei 37°C. Die Lösungen waren ohne Antibioticum vortemperiert worden. Gestartet (Reaktionszeit = 0) wurde durch Zugabe des Chromomycins. Da die Endextinktionen bei den einzelnen Ansätzen verschieden waren, wurde zum besseren Vergleich auf der Ordinate die prozentuale Änderung bezogen auf den jeweiligen Endwert (=100%) aufgetragen.

Einen ähnlichen Effekt zeigen auch Eisen-II-Ionen, nicht aber Eisen-III-Ionen (Fig.5). Es ist unter diesen Umständen nicht verwunderlich, daß die Assoziatbildung in Gegenwart von Komplexbildnern wie AedTE oder Citrat selbst bei neutralem pH deutlich verlangsamt ist (Fig.5).

Wir haben versucht, den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt bei der Assoziatbildung durch die beschleunigende Wirkung zweiwertiger Metallionen zu erfassen. Hierzu haben wir die Assoziatbildung optisch einmal nach Vorinkubation des Chromomycins mit Magnesium und in einem andern Versuch nach Vorbehandlung der DNA mit Magnesium kinetisch verfolgt. Wir fanden keinen Unterschied. Es kann somit nicht die Bildung eines Chromomycin-Magnesium- oder DNA-Magnesiumkomplexes die Geschwindigkeit der Assoziatbildung bestimmen.

II. Einfluß der Sekundärstruktur der DNA

Es liegen verschiedene Beobachtungen über die verhältnismäßig geringe Hemmwirkung des Chromomycins auf enzymatische Reaktionen, die an einsträngigen DNA-Präparaten als Matrize ablaufen, vor. So wird die RNA-Polymerasereaktion an denaturierter DNA deutlich weniger als an nativer DNA gehemmt (Kaziro und Kamiyama 1965). Auch die DNA-Polymerasereaktion, bei welcher zunächst in einer raschen Reaktion der fehlende Strang in der DNA-Doppelhelix resynthetisiert

wird (Richardson et al 1964), wird durch das Antibiotikum bedeutend weniger als die DNA-abhängige RNA-Bildung inhibiert (Hartmann et al. 1964; Koschel et al. 1966). Diese Befunde lassen sich am einfachsten mit einer geringeren Bindung des Antibiotikums an einsträngige DNA deuten.

Tatsächlich ruft hitzedenaturierte DNA in Chromomycinlösungen eine deutlich geringere Extinktionszunahme bei 430 m μ als native DNA hervor (Ward et al. 1965). Dies ist allerdings noch kein Beweis für ein geringeres Bindungsvermögen von denaturierter DNA an das Antibiotikum. Der Extinktionskoeffizient des Chromomycin-Komplexes mit hitzedenaturierter DNA ist nämlich nach unseren Messungen kleiner als der des Komplexes mit nativer DNA (Tabelle 2). Die spektralphotometrische Bestimmung der Bindungskapazität (unter Magnesiumionenzusatz) von denaturierter DNA ergibt aber, daß nur auf 32 Nucleotide ein gebundenes Chromomycin trifft. Native DNA bindet unter den gleichen Bedingungen nahezu dreimal soviel Antibiotikum. Das noch verbleibende Bindungsvermögen von denaturierter DNA für das Antibiotikum kann durch kleinere, beim Abkühlen zurückgebildete Helixbereiche verursacht sein.

In der Gleichgewichtskonstanten der Assoziatbildung unterscheidet sich denaturierte von nativer DNA. Die wenigen an hitzedenaturierte DNA assoziierten Chromomycinmoleküle werden nämlich deutlich fester als an native DNA gebunden (Tabelle 3). Allerdings weisen auch schon die Unterschiede in den Spektren auf etwas verschiedenartige elektronische Wechselwirkungen hin (Fig.6).

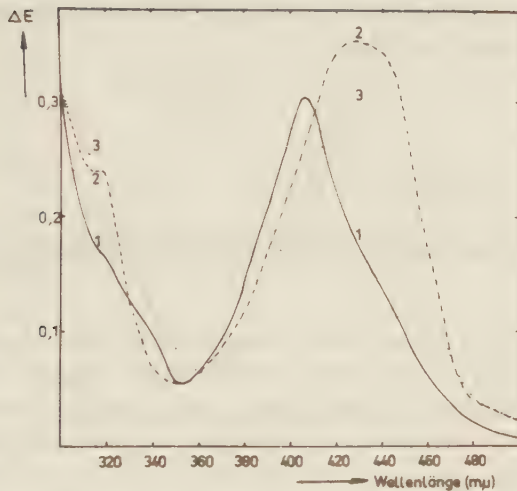


Fig.6. Einfluß von nativer und denaturierter DNA auf das Absorptionsspektrum von Chromomycin A_3 .
Zusammensetzung: 0,032 μMol Chromomycin A_3 und 0,2 μMol MgCl_2 in 0,05 M Kaliumphosphatpuffer pH 7,0 — (Kurve 1) ohne und mit ---- (Kurve 2) 3,0 μMol native DNA-P bzw. (Kurve 3) 4,0 μMol hitzedenaturierte DNA-P; Volumen 1,00 ml; Schichtdicke 10 mm; gemessen wurde gegen Vergleichsküvetten ohne Chromomycin A_3 .

Diese Versuche zeigen klar, daß die Sekundärstruktur der DNA einen großen Einfluß auf die Bindung des Antibioticums besitzt. ^x

III. Einfluß der Basenzusammensetzung der DNA

Chromomycin A₃ hemmt die DNA-abhängige RNA-Synthese kaum, wenn dAT und dIdC als Matrize verwendet werden (Ward et al. 1965). Dies kann damit gedeutet werden, daß zur Bindung des Antibioticums an die DNA, und damit zur Entfaltung der Inhibitorwirkung, Guanin in der Matrize unbedingt notwendig ist. Wir haben daher das Bindungsvermögen von DNA-Präparaten mit verschiedener Basenzusammensetzung spektralphotometrisch gemessen (Tabelle 3). Die Bindungskapazität nimmt mit fallendem

^xDie bei der Zugabe von Apyrimidinsäure, Apurinsäure und selbsthergestellter E. coli-tRNA zu Chromomycinlösungen beobachteten spektralen Veränderungen (Behr und Hartmann 1965) scheinen auf eine Verunreinigung in den Nucleinsäurelösungen zurückzugehen und nicht mit einer Bindung des Antibioticums zu interpretieren zu sein (Behr und Hartmann 1965). Die Spektralveränderungen verschwinden nämlich auf Zusatz von wenig Trilon zur Lösung und erscheinen auch nicht mehr bei Magnesiumzusatz. Wir haben sie auch nicht mit käuflicher tRNA aus E. coli (Worthington) und aus Bierhefe (Boehringer) beobachtet.

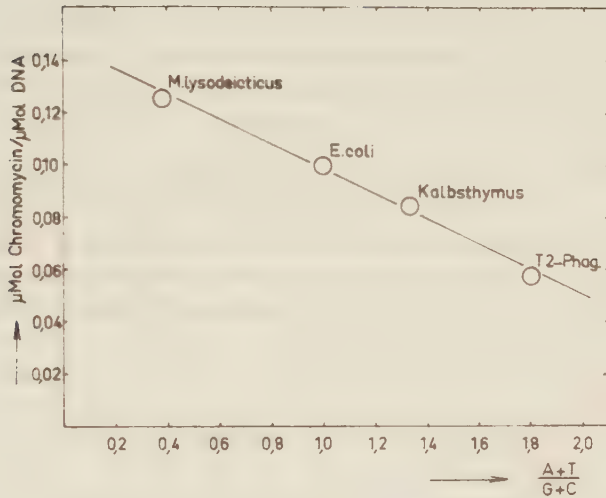


Fig.7. Abhängigkeit der Bindungskapazität der Nucleinsäuren für Chromomycin A₃ vom A+T/G+C -Verhältnis. Aufgetragen sind die in Tabelle 3 zusammengestellten Bindungskapazitäten (Ordinate) gegen das A+T/G+C -Verhältnis der verschiedenen Nucleinsäuren (für Kalbsthymus-DNA aus Tabelle 1; für M. lysodeicticus-DNA und E. coli-DNA nach Belozersky und Spirin 1960; für T2-Phagen-DNA nach Wyatt und Cohen 1953) (Abszisse).

A+T/G+C -Verhältnis linear zu (Fig.7).

Die Bindungskapazität steigt aber nicht proportional dem Guaniningehalt der eingesetzten DNA an. Würde jedes Guanin in den DNA-Präparaten auch ein Chromomycinmolekül binden, so würden auf jedes DNA-Nucleotid 0,18 - 0,37 Antibioticummoleküle treffen. Die beobachteten

Werte sind jedoch um einen Faktor drei bis vier kleiner. Dies ist nicht verwunderlich, da bei der Größe des Chromomycinmoleküls sehr wahrscheinlich zwei direkt benachbarte Guaninreste nicht zwei Antibioticummoleküle binden können.

Weitere Gründe für die verhältnismäßig geringe Bindungskapazität können darin liegen, daß ein schon assoziiertes Chromomycin auch über mehrere Nachbarn hinweg die Assoziation eines weiteren verhindern kann oder aber, daß noch weitere Basen für die Bindung notwendig sind.

IV. Größe des blockierten DNA-Abschnitts

1. Versuchsplanung

Für das Verständnis der biologischen Hemmwirkung des Chromomycins ist die Frage von Bedeutung, wie weit die Wirkung von gebundenem Chromomycin auf dem DNA-Strang reicht, um diesen dem Angriff von Enzymen zu entziehen.

Durch Hemmversuche mit Enzymen wie den DNA-abhängigen Polymerasen und Exonuclease, die sukzessiv in einer Richtung am DNA-Faden entlang ihre Wirkung entfalten, kann man hierauf keine Antwort finden. Solche Enzyme werden schon durch das erste Inhibitor-molekül auf der DNA-Helix in ihrer Wirkung gebremst.

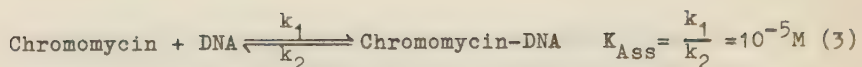
Anders ist die Wirkungsweise DNA-spezifischer Endonucleasen, wie der DNase I aus Pankreas. Dieses Enzym hydrolysiert Phosphodiesterbindungen auch im Innern der DNA.

Wir haben unsere Frage nach der Länge geschützter DNA-Abschnitte mit diesem Enzym untersucht. Je nach dem Umfang der Schutzwirkung sollten Nucleinsäurebruchstücke verschiedener Größe zurückbleiben. Ihre Größe und ihr Gehalt an gebundenem Chromomycin sollte eine Aussage über die durchschnittliche Länge des geschützten Nucleinsäurestrangabschnitts gestatten.

Läßt man auf DNA, die im Durchschnitt auf 30 Nucleotide ein Chromomycinmolekül gebunden enthält, ein Gemisch aus Endo- und Exonucleasen einwirken, so werden die nicht durch das Antibioticum geschützten Strangabschnitte durch die Endonuclease (Pankreas-DNase) herausgeschnitten und anschließend durch die Exonuclease (Schlangengiftphosphodiesterase) bis zu den Mononucleotiden hydrolysiert. Da gleichzeitig im Ansatz noch Phosphatase (aus dem Schlangengift) war, geht der Abbau der Bruchstücke noch bis zu den Nucleosiden weiter.

Läuft diese Reaktion in einem Dialysierschlauch ab, so treten die Abbauprodukte in die Dialysierflüssigkeit über, während im Schlauch die höhermolekularen, durch ihre dichte Besetzung mit Antibioticum vor dem Angriff der Nucleasen geschützten DNA-Bruchstücke zurückbleiben. Ihre Größe wird davon bestimmt, wie nahe an die Haftstellen des Chromomycins heran die Enzyme ihre Wirkung entfalten können. Sitzen mehrere Chromomycinmoleküle so nahe beieinander, daß die Endonuclease nicht zwischen diesen Molekülen ihre Wirkung entfalten kann, so bleibt ein größerer DNA-Abschnitt erhalten.

Die Abbaureaktion wird jedoch nicht plötzlich zum Stillstand kommen, da Chromomycin entsprechend seiner Assoziationskonstanten K_{Ass}



nicht irreversibel an DNA gebunden ist. Entsprechend der Geschwindigkeit, mit der das Antibioticum von der DNA abdissoziiert, können die entstehenden ungeschützten Abschnitte ebenfalls hydrolysiert werden. Allerdings wird dieser Abbau wesentlich langsamer ablaufen als die Hydrolyse chromomycinfreier Helixabschnitte.

2. Verlauf der Hydrolyse

Die Kinetik des Abbaus kann optisch sehr leicht verfolgt werden. Man mißt hierzu die in die Dialysierflüssigkeit austretenden Nucleoside (bei 260 m μ) und das Chromomycin (bei 420 m μ). Unmittelbar nach dem Start der Reaktion beginnt ein kräftiger Abbau der DNA, wie die Zunahme der Extinktion bei 260 m μ in der Dialysierflüssigkeit anzeigt (Fig.8, Kurve 1). Chromomycin dialysiert -von einer geringfügigen Menge am Anfang abgesehen- bis etwa zur 32. Stunde kaum aus dem Reaktionsgemisch (Fig.8, Kurve 2).

Im Schlauchinnern ist die Abnahme der Nucleotidkonzentration zunächst kaum bemerkbar. Die Absorption bei 260 m μ nimmt sogar am Anfang wegen des hyperchromen Effekts bei der DNA-Hydrolyse zu. Im weiteren Verlauf beobachtet man aber dann auch einen starken Extinktionsabfall, der sich erst später verlangsamt (Fig.8, Kurve 3). Nach Abbau des ungeschützten Teils der DNA kommt die Reaktion erwartungsgemäß noch nicht zum Stillstand. Chromomycin dissoziiert langsam von den Bruchstücken ab und erscheint in der Dialysierflüssigkeit. Im gleichen Maße schließt sich

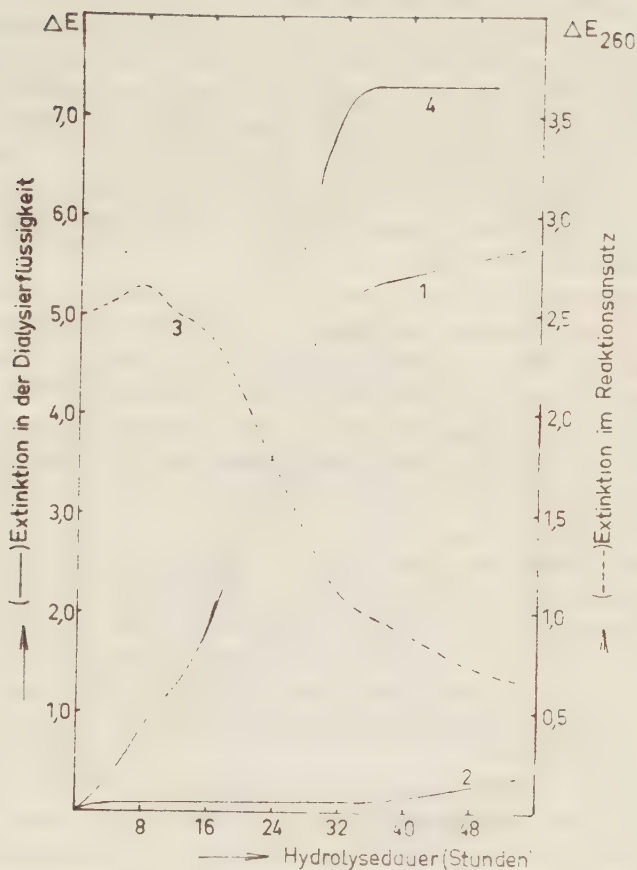


Fig.8. Verlauf der Hydrolyse von chromomycinhaltiger und chromomycinfreier DNA.

Zusammensetzung: 314 μmol DNA-P und 80 μmol MgCl_2 in 78 ml 0,05 M TRIS-HCl-Puffer pH 8,5 ohne (Kurve 4) und mit 9,12 μmol Chromomycin A_3 (Kurve 1, 2, 3) wurden 30 Minuten bei 37°C inkubiert und in einen einseitig geschlossenen Dialysierschlauch

(Visking 27/32; 20 cm lang) gefüllt, der am oberen offenen Ende über ein Glasrohr gezogen war. Es wurde sowohl im Schlauch (mit einem flachgedrückten Glasstab von oben) wie auch im Dialysepuffer (190 ml 0,001 M $MgCl_2$ + 0,05 M TRIS-HCl-Puffer pH 8,5 in einem 250 ml Meßzylinder)(Magnetrührer unter dem Thermostat) gerührt. Die Hydrolyse wurde gestartet durch Zugabe von 1 ml einer Lösung mit 10 μg Pankreas-DNase I + 1 mg *Crotalus adamanteus* Gift. Nach 14 und 40 Stunden wurden nochmals je 1 ml dieser Enzymmischung zugefügt.

Proben von 3 ml wurden nach 1, 2, 4, 6, 9, 13, 17, 22, 27, 33, 41 und 46 Stunden entnommen. Ende der Hydrolyse nach 54 Stunden. Die Dialysepuffer wurden nach 1, 2, 4, 6, 10, 13, 17, 20, 23, 26, 29, 32, 35, 38, 41, 46, 48, 51 und 54 Stunden gewechselt.

Die Kurven 1 (mit Chromomycin) und 4 (ohne Chromomycin) wurden durch Addition der bei 10 mm Schichtdicke bei 260 $m\mu$ in den einzelnen Dialysepuffern gemessenen Extinktionen erhalten (linke Ordinate).

Zur Messung des ausgetretenen Chromomycins (Kurve 2) wurden die Dialysepuffer auf das Zehnfache eingengt. Da das Spektrum des freien Chromomycins in der dann resultierenden Pufferkonzentration etwas ins Langwellige verschoben war, wurden die bei 420 $m\mu$ und 10 mm Schichtdicke gemessenen Werte (wieder durch Addition der in den einzelnen Puffern gemessenen Werte) aufgetragen (linke Ordinate).

Auf der rechten Ordinate sind die bei 1 mm Schichtdicke zu den jeweiligen Zeiten im Dialysierschlauch bei 260 $m\mu$ gemessenen Extinktionen aufgetragen (Kurve 3).

Die Enzymzugabe nach 14 Stunden erhöht die Hydrolysegeschwindigkeit reiner DNA auf das nahezu Doppelte. Die Enzymzugabe nach 40 Stunden bewirkt keine Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit der Hydrolyse chromomycinhaltiger DNA (reine DNA ist hier schon völlig abgebaut) mehr; hier ist offenbar die Abdissoziation des Chromomycins von den Nucleinsäurebruchstücken die geschwindigkeitsbegrenzende Reaktion.

die Hydrolyse der freiwerdenden Bruchstücke an.

In einem Kontrollexperiment wird DNA ohne Antibioticum während der Versuchszeit vollkommen abgebaut. In diesem Versuch erscheint in der Dialysierflüssigkeit etwa 25% mehr an UV-absorbierendem Material. Somit wird von Kalbsthymus-DNA, die auf etwa 30 Nucleotide ein Antibioticum-molekül enthält, etwa ein Viertel der DNA vor der Einwirkung der Nucleasen geschützt.

3. Chromomycinhaltige Abbauprodukte

Orientierende Versuche hatten gezeigt, daß die Assoziatbruchstücke bei der Elektrophorese in neutralem Medium nicht zerfallen (Behr 1965). Zur Abtrennung von freiem Chromomycin, Nucleosiden und Proteinen reinigten wir das im Schlauch zurückbleibende Material vor seiner Analyse durch Elektrophorese auf Bio-Gel P-2 als inertem Trägermaterial. In 0,05 M Kaliumphosphatpuffer pH 7,0 wandern die Assoziatbruchstücke einheitlich als gelber Fleck zur Anode (Fig.9). Nach der Elution vom Trägermaterial können sie durch Dialyse von unerwünschten anorganischen Salzen befreit werden.

In der analytischen Ultrazentrifuge sedimentiert das isolierte Produkt einheitlich mit einer Sedimentationskonstante $S_{25} = 3,1 \pm 0,3$ S (Tabelle 4). Weder dieses Ergebnis noch die einheitliche Wanderungsgeschwindigkeit in der Elektrophorese reichen aus, um eine Aussage über die Einheitlichkeit des Reaktionsproduktes hinsichtlich der Länge und der Nucleotidsequenz machen zu können. Es ist vielmehr beim Abbau ein Gemisch von Bruchstücken zu erwarten, da es sicher in der DNA-Helix mehrere Abschnitte

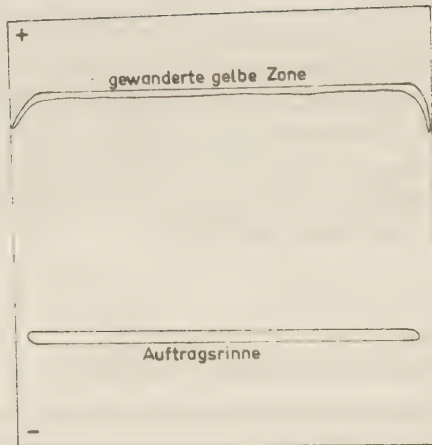


Fig.9. Elektrophorese der Assoziatbruchstücke auf Bio-Gel P-2.

Elektrophoresiert wurde in einer 0,5 cm dicken Bio-Gel P-2-Schicht in 0,05 M Kaliumphosphatpuffer pH 7,0 im Pherograph nach Wieland-Pfleiderer bei 550-650 V und 65-50 mA 3-4 Stunden lang.

Zur Gewinnung der Bruchstücke wurde die gewanderte, im UV-Licht hell aufstrahlende, gelbe Zone mit bidestilliertem Wasser eluiert.

gibt, in denen gehäuft die Bedingungen für die Anlagerung von Chromomycin erfüllt sind. Mit einem Diffusionskoeffizienten $D_{20} = 7,4 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ sec}^{-1}$ (Tabelle 4) und einem partiellen spezifischen Volumen von 0,55 ml/g (Aten und Cohen 1965) läßt sich aus der Sedimentationskonstanten eine durchschnittliche Molekulargewichtsgrößenordnung

von 23000 für die Assoziatbruchstücke abschätzen.

Im Assoziatabbauprodukt liegt das Chromomycin offensichtlich in einer ähnlichen Weise gebunden vor wie im Komplex mit hochmolekularer DNA. Auch hier ist sein Spektrum durch die Absorptionsmaxima bei 317 und 430 m μ gegenüber dem freien Antibioticum verändert (Fig.10). Die Absorption im UV-Bereich wird im wesentlichen durch den Nucleotidgehalt der Abbauprodukte bestimmt. Bei 260 m μ errechnet sich ein Extinktionskoeffizient $\epsilon_{260}=8,8 \text{ cm}^2/\mu\text{Mol Nucleotid-P}$ gegenüber 7,0 bei nativer DNA. Der Chromomycinanteil macht sich nur durch sein Maximum bei 280 m μ als Schulter zwischen 270 und 290 m μ bemerkbar (Fig.10).

Die optische Chromomycinbestimmung im isosbestischen Punkt und die Phosphatanalyse nach King (King 1932) ergeben, daß auf 8,3 Nucleotidphosphate ein gebundenes Chromomycin trifft. Der Antibioticumgehalt der Abbauprodukte aus Kalbsthymus-DNA und Chromomycin A₃ nähert sich somit dem des Assoziats der besonders guaninreichen *Micrococcus lysodeicticus*-DNA an.

Aus der Basenanalyse errechnet sich ein A+T/G+C -Verhältnis von 0,53. Auch hierin kommt das Hydrolyseprodukt des Kalbsthymus-DNA-Assoziats dem hochmolekularen *Micrococcus lysodeicticus*-DNA-Komplex nahe. Dieses Verhältnis liegt im Reaktionsprodukt jedoch nicht von Beginn der Abbaureaktion an vor, sondern wird langsam im Laufe der Hydrolyse erreicht. Dies ergab sich aus der Basenanalyse von Proben, die während des Hydrolysevorgangs aus dem Ansatz entnommen und durch Gelelektrophorese gereinigt worden waren (Fig.11).

Mit der Abnahme des A+T/G+C -Verhältnisses ist eine entsprechende Erhöhung des Chromomycinanteils in den Abbauprodukten verbunden, wie man aus dem Verhältnis $\Delta E_{430}/\Delta E_{260}$

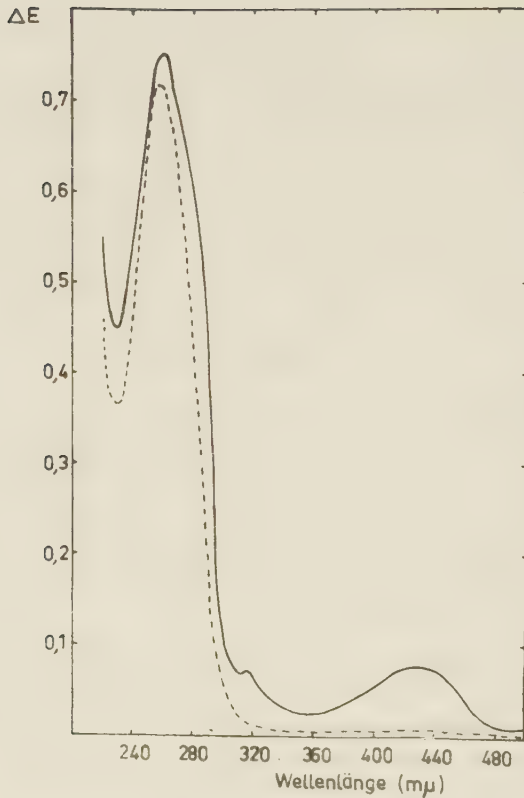


Fig.10. Spektrum des chromomycinhaltigen und chromomycinfreien Abbauproduktes.

Zusammensetzung: 0,086 μMol DNA-P — chromomycinhaltiges bzw.----- chromomycinfreies Bruchstück in Natrium-Kaliumphosphatpuffer pH 7,0, Ionenstärke I = 0,1 (Green 1933); Volumen 1,00 ml; Schichtdicke 10 mm; gemessen wurde gegen Vergleichsküvetten mit Pufferlösung.

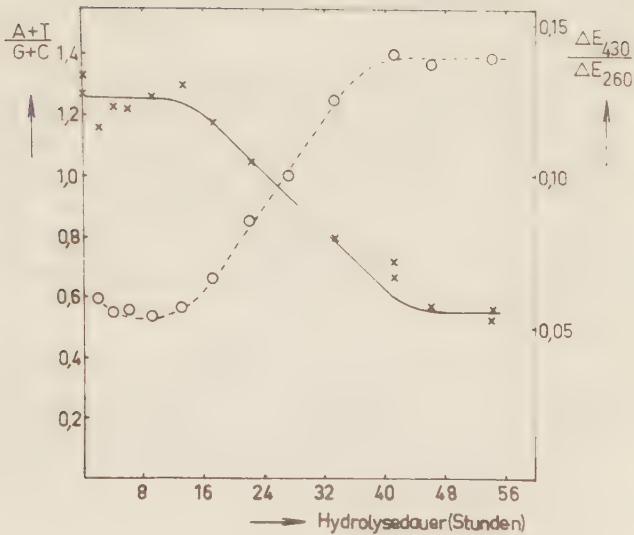


Fig.11. Änderung des A+T/G+C - und des Chromomycin/Nucleotid-Verhältnisses im Assoziat während der enzymatischen Hydrolyse.

Das A+T/G+C-Verhältnis wurde auf Grund der Basenanalyse der elektrophoresierten und gegen Wasser dialysierten Proben bestimmt (linke Ordinate).

Als Chromomycin/Nucleotid-Verhältnis wurde der Quotient der Absorption bei 430 m μ zur Absorption bei 260 m μ angegeben. Bestimmt wurden die Extinktionen in den elektrophoresierten und eingeeengten Proben in Küvetten mit 1 mm Schichtdicke. Gemessen wurde gegen Vergleichsküvetten mit Wasser.

für die isolierten und gereinigten Proben sieht (Fig.11).

Die Basenanalyse des Reaktionsproduktes ergibt auch, daß ebensoviel Adenin wie Thymin und Guanin wie Cytosin vorhanden ist. Diese Komplementarität spricht dafür, daß die Abbauprodukte in Form von Doppelspiralstücken vorliegen. Diese Deutung steht auch im Einklang mit unserer Beobachtung, daß doppelsträngige, native DNA weit mehr Chromomycin bindet als hitzedenaturierte Nucleinsäure (vgl. Abschnitt II).

Auch das Verhalten der Abbauprodukte beim Erwärmen steht hiermit nicht im Widerspruch. Hierbei nimmt die Extinktion bei 260 m μ um insgesamt 20% des Ausgangswertes zu bei einer mittleren Umwandlungstemperatur von 55°C (Fig.12). Da der Schmelzvorgang ein kooperativer Prozeß ist und seine Schärfe von der Helixlänge abhängt (Crothers et al. 1965), ist es nicht verwunderlich, daß DNA-Doppelspiralbruchstücke dieser geringen Größe beim Erwärmen keinen sehr scharf ausgeprägten hyperchromen Effekt mehr zeigen.

4. Chromomycinfreie Abbauprodukte

Bei der Perforation der chromomycinhaltigen Abbauprodukte im schwachsauren Bereich mit Äther wird das Chromomycin aus dem Komplex innerhalb von fünf Tagen zu einem beträchtlichen Teil herausextrahiert. Die in der wässrigen Phase zurückbleibenden Nucleinsäurebruchstücke enthalten auf 138 DNA-Nucleotide nur noch ein gebundenes Chromomycinmolekül. Durch Dialyse kann die Lösung von unerwünschten anorganischen Salzen befreit werden.

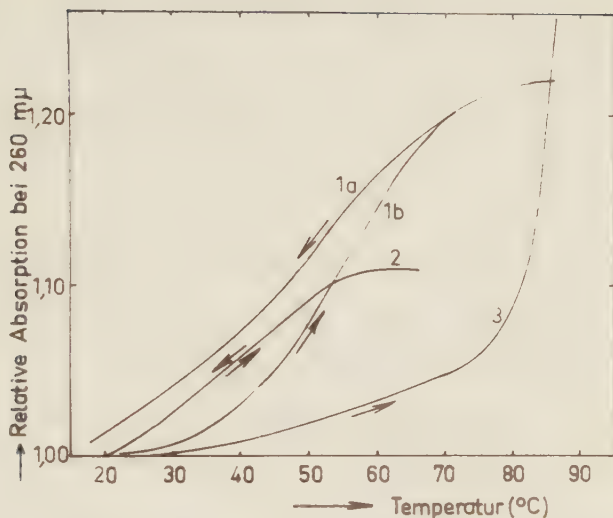


Fig.12. Schmelzkurven (→) und Abkühlungskurven (←) der chromomycinhaltigen (Kurve 1) und chromomycinfreien (Kurve 2) Hydrolyseprodukte. Als Vergleich die Schmelzkurve von Kalbsthymus-DNA (Kurve 3).

Lösungsmittel: 0,15 M NaCl + 0,015 M Natriumcitrat (Marmur und Doty 1959). Gemessen wurde in verschlossenen Quarzküvetten (Schichtdicke 10 mm) gegen Vergleichsküvetten mit dem Lösungsmittel im Spektralphotometer Zeiss PMQ II mit temperierbarem Küvettenhalter. Aufgeheizt wurde mit etwa 0,3°C/Minute. Auf der Ordinate ist die relative Extinktionszunahme bei 260 mμ aufgetragen (Anfangswert = 1,000).

Die chromomycinarmlen Abbauprodukte sedimentieren in der analytischen Ultrazentrifuge einheitlich mit einer Sedimentationskonstante $S_{25} = 2,4 \text{ S}$ (Tabelle 4). Mit einem Diffusionskoeffizienten $D_{20} = 8,5 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ sec}^{-1}$ (Tabelle 4) und einem partiellen spezifischen Volumen von $0,55 \text{ ml/g}$ (Aten und Cohen 1965) läßt sich in diesem Fall eine durchschnittliche Molekulargewichtsgrößenordnung von 15000 (entsprechend etwa 20 Nucleotidbasenpaaren) abschätzen. Dies steht im Einklang mit dem Molekulargewichtsanteil von 17000 für die Nucleinsäure der chromomycinhaltigen Abbauprodukte nach Abzug des Antibioticumsanteils (6000). Die Extraktion im schwachsauren Bereich hat den Oligonucleotiden offenbar nicht geschadet.

Im UV-Bereich des Spektrums der Bruchstücke fehlt jetzt die Schulter zwischen 270 und 290 $\text{m}\mu$ wegen der weitgehenden Abtrennung des Antibioticums. Man findet auch nur noch eine sehr kleine Absorption im sichtbaren Bereich (Fig.10). Bei 260 $\text{m}\mu$ errechnet sich ein Extinktionskoeffizient $\epsilon_{260} = 8,3 \text{ cm}^2/\mu\text{Mol Nucleotid-P}$ gegenüber 8,8 bei den chromomycinhaltigen DNA-Abbauprodukten und 7,0 bei nativer DNA.

Die Basenanalyse liefert erwartungsgemäß die gleichen Ergebnisse wie für die chromomycinhaltigen Bruchstücke (Tabelle 1).

Beim Erwärmen der Lösung beobachtet man eine langsame Extinktionszunahme bei 260 $\text{m}\mu$, die beim langsamen Abkühlen wieder vollkommen zurückgeht (Fig.12). Schreckt man allerdings die erhitzte Lösung rasch im Eisbad ab, dann nimmt die Extinktion bei 260 $\text{m}\mu$ nur etwa um 7% ab. Diese Beobachtungen sprechen dafür, daß die Abbauprodukte auch nach dem Entfernen des Antibioticums noch eine geordnete Struktur besitzen, die beim Erwärmen verlorengeht und beim raschen Abkühlen auch nicht sofort wieder gewonnen

wird. Für eine solche Gestaltveränderung beim Erhitzen der chromomycinfreien Abbauprodukte spricht auch die Abnahme der Sedimentationskonstanten auf $S_{25} = 1,3 \text{ S}$ (Tabelle 4), die man mit der erhitzten und abgeschreckten Lösung beobachtet.

5. Assoziatbildung der chromomycinfreien Abbauprodukte

Ein Anlaß für die Isolierung der chromomycinarmen Abbauprodukte war die Überlegung, daß hiermit DNA-Abschnitte isoliert würden, die in besonderem Maße die strukturellen Gegebenheiten für die Bindung von Chromomycin A_3 besitzen. Aus diesem Grund war es von besonderem Interesse, ihre Bindungskapazität für Chromomycin zu bestimmen.

Erwartungsgemäß fanden wir, daß die isolierten chromomycinfreien Bruchstücke auch nach diesen Abbau- und Reinigungsoperationen noch in der Lage sind, Chromomycin zu binden. Die bei der Zugabe eines Überschusses der isolierten chromomycinfreien Bruchstücke zu einer Chromomycinlösung beobachteten spektralen Veränderungen (Fig. 13) sind denen im Assoziat aus nativer DNA und Chromomycin ähnlich. Nur die Absorption im Maximum des Assoziats bei $430 \text{ m}\mu$ ist etwas geringer (Tabelle 2), und das Minimum ist etwas ins Langwellige (von 350 nach $360 \text{ m}\mu$) verschoben. Bei Zusatz von genügend Chromomycin beladen sich die DNA-Abbauprodukte so weitgehend mit dem Antibioticum, daß auf etwa 10 Nucleotide ein gebundenes Chromomycin trifft. Offensichtlich sind die für die Assoziation des Antibioticums notwendigen strukturellen Voraussetzungen in der DNA in den Bruchstücken auch nach allen Abbau- und Reinigungsoperationen immer noch weitgehend erhalten. Auch in der Assoziationskonstanten unterscheiden sich die Abbauprodukte nicht von nativer DNA (Tabelle 3).

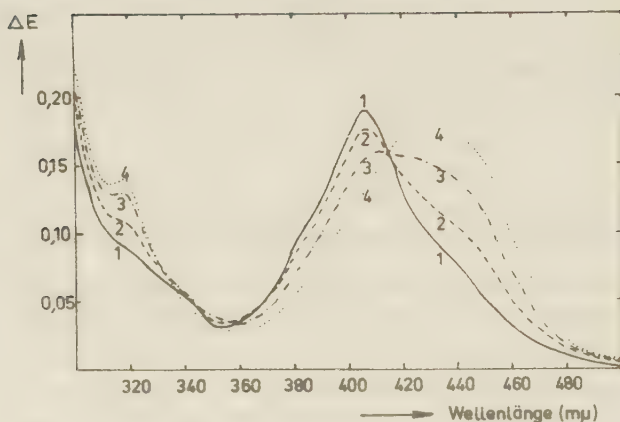


Fig.13. Veränderung des Chromomycinspektrums bei Zugabe der chromomycinfreien DNA-Abbauprodukte.

Zusammensetzung: 0,020 μMol Chromomycin A_3 und 0,2 μMol MgCl_2 in 0,05 M Kaliumphosphatpuffer pH 7,0 — (Kurve 1) ohne und mit ---- (Kurve 2) 0,046 μMol DNA-P, - · - · - (Kurve 3) 0,114 μMol DNA-P und · · · · · 0,216 μMol DNA-P Abbauprodukt; Volumen 1,00 ml; Schichtdicke 10 mm; gemessen wurde gegen vergleichsküvetten ohne Chromomycin A_3 .

D i s k u s s i o n

Guanin ist für die Bindung von Chromomycin A_3 an DNA nach Ward et al. (Ward et al. 1965) essentiell. Der Guaniningehalt der DNA ist aber nicht allein der begrenzende Faktor für das Bindungsvermögen. Wir konnten nämlich zeigen, daß die Bindungskapazität einer DNA mit ihrem Guaniningehalt zunächst rasch, dann aber immer langsamer zunimmt (Fig.14). Bei *Micrococcus lysodeicticus*-DNA

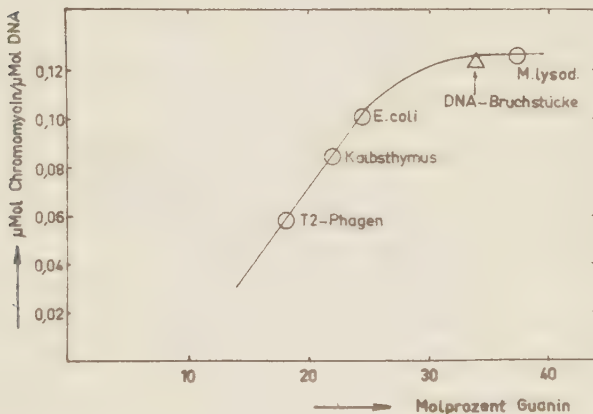


Fig.14. Abhängigkeit des Bindungsvermögens von DNA für Chromomycin A_3 vom Guaniningehalt.

Aufgetragen sind die in Tabelle 3 zusammengestellten Bindungskapazitäten (O) bzw. der Chromomycingehalt der DNA-Bruchstücke (Δ) (Ordinate) gegen den Guaniningehalt der verschiedenen Nucleinsäuren (für Kalbsthymus-DNA und die DNA-Bruchstücke aus Tabelle 1; für *M. lysodeicticus*-DNA und *E. coli*-DNA nach Belozersky und Spirin 1960; für T2-Phagen-DNA nach Wyatt und Cohen 1953) (Abszisse).

ist offenbar schon die Grenze des Bindungsvermögens mit einem Chromomycinmolekül auf vier Basenpaare der DNA erreicht.

Aus Modellbetrachtungen erkennt man, daß ein Chromomycinmolekül mit seinen umfangreichen Zuckerseitenketten bei der Assoziation mit DNA vier Basenpaare der Helix überdecken kann. Wir schließen hieraus, daß die Bindungskapazität durch die gegenseitige sterische Behinderung der Inhibitormoleküle begrenzt ist.

Welche Faktoren bestimmen aber die Größe des Abschnitts auf der DNA-Helix, der durch ein Chromomycinmolekül der Einwirkung der Enzyme entzogen wird?

Für die Beantwortung dieser Frage haben die folgenden oben mitgeteilten Beobachtungen besondere Bedeutung:

1. Assoziante, in denen ein Antibioticummolekül im Durchschnitt auf 30 Nucleotide trifft, lassen sich zu Bruchstücken abbauen, in denen das entsprechende Verhältnis eins zu vier Basenpaaren beträgt;
2. In den Bruchstücken ist ebensoviel Adenin wie Thymin bzw. Guanin wie Cytosin enthalten. Sie zeigen beim Erwärmen einen ausgeprägten hyperchromen Effekt;
3. Chromomycin bindet sich in wesentlichem Umfang nur an doppelsträngige DNA.

Diese Befunde deuten darauf hin, daß durch ein assoziiertes Chromomycinmolekül ein doppelsträngiger Helixabschnitt der DNA mit vier Basenpaaren der Wirkung der Enzyme entzogen ist.

Die Gleichheit des Bindungsvermögens von DNA für Chromomycin mit dem Antibioticumgehalt der enzymatischen Abbauprodukte legt somit nahe zu vermuten, daß auch für die abschirmende Wirkung des Chromomycins gegenüber Enzymen

im wesentlichen die sterische Behinderung verantwortlich ist.

Über die Orientierung des assoziierten Chromomycinmoleküls zur DNA-Helix erlauben die hier mitgeteilten Messungen noch keine Aussagen.

Gewisse Hinweise gibt die charakteristische Beeinflussung des chromophoren Systems des Antibioticums durch doppelsträngige Helixabschnitte, wie sie in nativer DNA, aber auch in den Abbauprodukten vorliegen. Desoxynucleoside und Monodesoxynucleotide (Ward et al. 1965; Behr und Hartmann 1965) haben selbst in Konzentrationen von 5 $\mu\text{Mol/ml}$, in denen sie beim Actinomycin schon spektrale Veränderungen auslösen (Kersten 1961), überhaupt keine Wirkung. Man darf daher annehmen, daß die Veränderung im Absorptionsspektrum des Chromomycins durch eine enge parallele Anlagerung der Inhibitormoleküle in die geordnete Struktur der DNA-Helix, wie sie für Actinomycin diskutiert wird (Reich und Goldberg 1964), bewirkt wird. Die Bindung wird vielleicht durch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den phenolischen Hydroxylgruppen in der 8- und 9-Stellung und durch die Carbonylgruppe in der 1-Stellung des Chromomycinrings an Guaninreste vermittelt.

Die in der 2- und 6-Stellung glycosidisch angehefteten umfangreichen Zuckerreste stören die Einlagerung in den Schraubengang der DNA wenig. Der im Vergleich zu anderen Kohlehydraten verhältnismäßig lipophile Charakter dieser weitgehend acetylierten und methylierten Didesoxyzucker fördert vielleicht noch hydrophobe Wechselwirkungen zum hydrophoben Innern des DNA-Schraubengangs. Wie die Abnahme der Inhibitorwirkung beim Abbau der Zuckerreste gezeigt hat (Koschel et al. 1966), tragen die Zuckerseitenketten zur Stabilisierung des Assoziats sogar bei.

Z u s a m m e n f a s s u n g

Die außerordentlich hohe cytostatische Wirkung des Antibioticums Chromomycin A₃ wird durch die Blockierung der biologischen Funktionen der DNA erklärt.

Diese wird verursacht durch eine Assoziation des Antibioticums mit der Nucleinsäure. Wir haben uns in der vorliegenden Arbeit mit den Eigenschaften des Assoziats näher befaßt.

1. Für die Assoziatbildung mit der DNA sind zweiwertige Metallionen notwendig. Sie beschleunigen die Assoziatbildung erheblich.
2. Für die Bindung des Antibioticums ist die geordnete Helixstruktur der DNA wesentlich.
3. Das Bindungsvermögen einer Desoxyribonucleinsäure für Chromomycin A₃ nimmt mit dem GC-Gehalt zu, um bei etwa 30-35% GC einen Grenzwert von einem Antibioticum auf ca. vier Basenpaare zu erreichen.
4. Beim enzymatischen Abbau chromomycinhaltiger DNA bleiben doppelsträngige Oligodesoxynucleotide zurück, die im Durchschnitt auf vier Basenpaare ein Antibioticummolekül enthalten. In diesen Abbauprodukten müssen die strukturellen Voraussetzungen für die Bindung des Chromomycins besonders gegeben sein; denn die chromomycinfreien Abbauprodukte lassen sich wieder sehr weitgehend mit Chromomycin beladen.
5. Sowohl dem Bindungsvermögen wie auch der Reichweite der Inhibitorwirkung sind durch die Größe des Chromomycinmoleküls (sterische Faktoren) Grenzen gesetzt.

L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s

ATEN, I. B. T., und COHEN, J. A., J. Mol. Biol. 12
(1965) 537.

BEHR, W., Diplomarbeit Würzburg 1965.

BEHR, W., und HARTMANN, G., Biochem. Z. 343 (1965)
519.

BELOZERSKY, A. N., und SPIRIN, A. S., in The Nucleic
Acids (Edited by E. Chargaff and J.N.
Davidson), Academic Press Inc., New York
and London 1960, Vol. III, p. 147.

BERLIN, Y. A., ESIPOV, S. E., KOLOSOV, M. N., und
SHEMYAKIN, M. M., Tetrahedron Letters
(1966) 1643.

CROTHERS, D. M., KALLENBACH, N. R., und ZIMM, B. H.,
J. Mol. Biol. 11 (1965) 802.

GIERER, A., und SCHRAMM, G., Z. Naturforsch. 11b
(1956) 138.

GREEN, A. A., J. Am. Chem. Soc. 55 (1933) 2331.

HARTMANN, G., GOLLER, H., KOSCHEL, K., KERSTEN, W.,
und KERSTEN, H., Biochem. Z. 341 (1964)
126.

KAISER, A. D., und HOGNESS, D. S., J. Mol. Biol. 2
(1960) 396.

- KAMIYAMA, M., und KAZIRO, Y., J. Biochem. (Tokyo), 59 (1966) 49.
- KAZIRO, Y., und KAMIYAMA, M., Biochem. Biophys. Res. Commun. 19 (1965) 433.
- KERSTEN, W., Biochim. Biophys. Acta, 47 (1961) 610.
- KERSTEN, W., und KERSTEN, H., Biochem. Z. 341 (1965) 174.
- KERSTEN, W., KERSTEN, H., und SZYBALSKI, W., Biochemistry 5 (1966) 236.
- KIDA, M., UJIHARA, M., OHMURA, E., und KAZIWARA, K., J. Biochem. (Tokyo), 59 (1966) 353.
- KING, E., Biochem. J. 26 (1932) 292.
- KLOTZ, I. M., in The Proteins (Edited by H. Neurath and K. Bailey), Academic Press Inc., Publishers, New York 1953, Vol. Ib, p. 764.
- KOSCHEL, K., Unveröffentlicht.
- KOSCHEL, K., HARTMANN, G., KERSTEN, W., und KERSTEN, H., Biochem. Z. 344 (1966) 7b.
- LIERSCH, M., Diplomarbeit Würzburg 1964.
- MARMUR, J., J. Mol. Biol. 3 (1961) 208.
- MARMUR, J., und DOTY, P., Nature 183 (1959) 1427.
- MIYAMOTO, M., KAWAMATSU, Y., KAWASHIMA, K., SHINOHARA, M., und NAKANISHI, K., Tetrahedron Letters (1966) 545.

- REICH, E., und GOLDBERG, I. H., in Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology (Edited by J. N. Davidson and W. E. Cohn), Academic Press, New York and London 1964, Vol. III, p. 183.
- RICHARDSON, C. C., INMAN, R. B., und KORNBERG, A., J. Mol. Biol. 9 (1964) 46.
- SATO, K., OKAMURA, N., UTAGAWA, K., ITO, Y., und WATANABE, M., Jap. J. Pharmacol. 10 (1960) 1.
- SCHWARZENBACH, G., und FLASCHKA, H., in Die chemische Analyse (herausgegeben von W. Koch), Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart 1965, Band 45, Seite 6.
- WAKISAKA, G., UCHINO, H., NAKAMURA, T., SOTOBAYASHI, H., SHIRAKAWA, S., ADACHI, A., und SAKURAI, M., Nature 198 (1963) 385.
- WARD, D. C., REICH, E., und GOLDBERG, I. H., Science 149 (1965) 1259.
- WACKER, W. E. C., und VALLEE, B. L., J. Biol. Chem. 234 (1959) 3257.
- WYATT, G. R., und COHEN, S. S., Biochem. J. 55 (1953) 774.
- ZAMENHOF, S., in Biochemical Preparations (Edited by C. S. Vetsling), J. Wiley & Sons, Inc., New York 1958, Vol. VI, p. 8.

A b k ü r z u n g s v e r z e i c h n i s

A	Adenin
AeDTE	Äthylendiamintetraessigsäure
C	Cytosin
dAT	Copolymeres aus Desoxyadenosinmonophosphat und Desoxythymidinmonophosphat
dGdC	Mischung der Homopolymeres aus Desoxyguanosinmonophosphat und Desoxycitidinmonophosphat
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DNA-P	Phosphatgehalt des Nucleinsäurepräparates (wird als Maß für die Nucleinsäuremenge verwendet)
DNase	Desoxyribonuclease (hier aus Pankreas)
G	Guanin
RNA	Ribonucleinsäure (-acid)
tRNA	transfer Ribonucleic Acid (=sRNA: lösliche Ribonucleic Acid oder lösliche Ribonucleinsäure)
T	Thymin
TRIS	Tris (Hydroxymethyl)-aminomethan

Lebenslauf

Am 23. April 1938 wurde ich als Sohn des kaufmännischen Angestellten Wilhelm Behr und seiner Ehefrau Hildegard Auguste, geb. Hüschemenger, in Gummersbach geboren. Vom Herbst 1944 bis Ostern 1949 besuchte ich die Volksschule in Osberghausen, Oberbergischer Kreis, und von April 1949 bis zur erfolgreichen Reifeprüfung im März 1958 das Städtische neusprachliche Gymnasium in Gummersbach.

Seit Sommersemester 1958 bin ich als Student der Chemie an der Universität Würzburg eingeschrieben. Im Februar 1962 legte ich die Diplomchemiker-Vorprüfung und im November 1964 die mündliche Diplomchemiker-Hauptprüfung ab. Meine Diplomarbeit wurde am 25. Juli 1965 angenommen.

Seit 29. Juni 1966 bin ich mit der Volksschullehrerin Gabriele Maria Ippisch aus Würzburg verheiratet.

Vom Wintersemester 1964/65 bis zum Wintersemester 1965/66 war ich als Semesterhilfskraft tätig. Seit März 1966 bin ich wissenschaftliche Hilfskraft mit Verwalterbescheinigung.

Die vorliegende Arbeit wurde von 1965 bis 1967 im Institut für Biochemie der Universität Würzburg unter der Anleitung von Herrn Professor Dr. G. Hartmann ausgeführt.

Ich habe mich noch bei keiner anderen Fakultät um den Doktorgrad beworben.

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren: G. Briegleb, H. Diergarten, E. Fahr, F.G. Fischer, H. Hahn, G. Hartmann, S. Hünig, H. Kulenkampff, S. Matthes, A. Roedig, W. Strohmeier, F. Turba, E. Wecker und E. Wüstenfeld.

OFFSETDRUCK GUGEL

Würzburg, Burkarderstr. 9

OFFSETDRUCK GUGEL

Würzburg, Burkarderstr. 9